

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

REC'D 14 FEB 2005

WIPO

PCT

Aktenzeichen:

103 50 131.2

Anmeldetag:

28. Oktober 2003

Anmelder/Inhaber:Alexander Cherkasky,
40477 Düsseldorf/DE**Bezeichnung:**Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinde-
und Mikrotubuli-Binderegionen**IPC:**

C 07 K 19/00

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 18. November 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Stanschus

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinde und Mikrotubuli - Binderegionen

Die Erfindung betrifft die Bereiche der Tumorphysiologie und der Biotechnologie.

In der Tumorthherapie stellen Operationen, Bestrahlung und Chemotherapie nach wie vor die entscheidenden Maßnahmen zur Therapie der Erkrankung dar. Bei der chemischen Tumorthherapie (Chemotherapie) werden je nach Tumortyp meist Zytostatika unterschiedlicher Wirkungsart verwendet, so etwa Alkylantien, Nitrosoharnstoffverbindungen, Folsäureantagonisten, Pyrimidin- und Purinanaloga wie Fluorouracil, Antibiotika mit Wirkung auf die DNA-abhängige RNA-Polymerase oder Enzyme wie L-Asparaginase. Eine Gruppe von Cytostatika für die Chemotherapie sind die Mitosehemmstoffe wie etwa Taxol und Vinca-Alkaloide.

Auf Grund ihrer sehr guten Antitumor-Aktivität haben besonders die Mitosehemmstoffe in letzter Zeit verstärkte Beachtung gefunden. Die Mitosehemmer beeinflussen den Aufbau oder Abbau der aus Mikrotubuli bestehenden Teilungsspindel – und greifen somit an der Zellteilung an. Das bekannte Colchicin oder Vinca-Alkaloide binden an spezifischen Bindestellen des α - oder β -Tubulins – als Baustein der Mikrotubuli – und bewirken z.B. eine Hemmung des Aufbaus der Mikrotubuli. Andere Mitosegifte – beispielsweise das Taxol – bewirkt deren Destabilisierung.

Mitose- oder Spindelgifte sind hochgradig toxisch und sind daher für therapeutisches Zwecke problematisch. Die Toxizität von Colchicin ist sogar so hoch, daß diese Substanz bislang gar nicht therapeutisch verwendet wird. Das aus Eiben (*Taxus*) isolierte Alkaloid Taxol ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung.

Die meisten Mitosehemmer binden an das β -Tubulin der Mikrotubuli. Dazu weisen sie Bindungsstellen auf, deren unterschiedliche hohe Spezifität für eine Klassifizierung der Mitosehemmer herangezogen wird. So werden verschiedene Gruppen wie der Colchizin-Typ, der Taxan-Typ, der Vinca Alkaloid Typ oder der Rhyoxin Typ unterschieden.

Auf Grund der hohen Toxizität der Zytostatika ist eine Therapie mit diesen Substanzen mit vielen Nebenwirkungen verbunden, die für die betroffenen Patienten oft kaum erträglich sind. Daher wird seit vielen Jahren an der Verbesserung der Therapien mit der Zielsetzung der Vermeidung oder Reduzierung der Nebenwirkungen gearbeitet. Ein Ansatz dazu stellt der Versuch dar, die Wirkstoffe gezielt nur zu den zu therapierenden Zellen – d.h. zu den Zielzellen - zu lenken.

Eine Möglichkeit zur Verwirklichung dieses Ansatzes basiert im wesentlichen darauf, zelltyp-spezifische Epitope zu identifizieren, einen Epitop-spezifischen monoklonalen Antikörper zu erzeugen und den derart gewonnen Antikörper oder Antigen-bindende Fragmente davon mit einem therapeutisch wirksamen Molekül zu koppeln. Ein derartiger Ansatz ist Gegenstand eines Forschungsprojekts der Universität von Kalifornien mit dem Ziel einer spezifischen Therapie von Brustkrebs (Sherie L. Morrison, Ph.D.: "Antibody Fusion. Proteins for the Therapy of Breast Cancer", University of California, Los Angeles, 1997-1999). Hierbei wurden Antikörper gegen die brustkrebsspezifischen Moleküle her2/neu und CEA verwendet und mit immunstimulierenden Molekülen verbunden, welche die Aktivität der T-Zellen stimulieren.

Obwohl dieser Ansatz mit dem Vorteil einer hohen therapeutischen Selektivität hergeht, ist er in der Praxis nur unter großen Anstrengungen bei hohem Aufwand und langer Entwicklungsdauer umzusetzen, da zahlreiche Entwicklungsschritte zu seiner Realisierung erforderlich sind. Hierzu müssen zunächst für den jeweiligen Zelltyp spezifische Antigene isoliert werden. Da es sich bei diesen in der Regel um Proteinantigene handelt, werden im folgenden zellspezifische Epitope des Antigens ermittelt, die möglichst geringe Ähnlichkeiten zu Epitopen der Proteine anderer Zelltypen aufweisen. Dies ist erforderlich zur Vermeidung von Kreuzreaktivitäten der therapeutisch eingesetzten Antikörper. Anschließend erfolgt die Herstellung monoklonaler, gegen das jeweilige Antigen gerichteter Antikörper, die im weiteren aufwendigen Selektions- und/oder Mutageneseverfahren wie etwa Phage Display unterzogen werden müssen, um zu einem Antikörper möglichst hoher Spezifität, bzw. möglichst geringer Kreuzreaktivität zu gelangen.

Darüber hinaus ergeben sich häufig Schwierigkeiten bei der Herstellung des gebrauchsfertigen Therapeutikums, da ein nicht-humaner Antikörper modifiziert werden muß, um ohne hohes allergenes Potential eingesetzt werden zu können. Dazu können die variablen Regionen, insbesondere jedoch die *Complementary determining regions* (CDR) in ein humanes Antikörpergerüst eingesetzt, wobei im fertigen Therapeutikum unterschiedlich große antigenspezifische Elemente des therapeutischen Antikörpers, so etwa die antigenbindenden Fragmente (Fab) zum Einsatz kommen. Dabei handelt es sich in aller Regel um antigenspezifische Elemente, die mindestens aus zwei separaten Polypeptidketten bestehen. Die Herstellung dieser komplexen antigenspezifischen Elemente und ihre Verknüpfung mit dem eigentlich therapeutischen Molekül ist in der Praxis oft aufwendig und erfordert komplexe Expressionskonstrukte und entsprechend geeignete Wirtszellen. Nachteile bestehen darin, dass penetrierende Antikörper entweder gar nicht oder mit radioaktiven Isotopen oder mit Cholera - Toxinen modifiziert sind.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, penetrierende Antikörper, vorzugsweise IgG so zu modifizieren, dass sie das Zellwachstum hemmen und somit Tumor und Protozoenzellen schädigen können.

Die Aufgabe der Erfindung wird Fusionsproteine enthaltend Antikörper - Binde - und Mikrotubuli - Binderegionen gelöst.

Die Wirkung dieser Fusionsprotein - Antikörper - Komplexen besteht darin, Mikrotubuli - bzw. Zytoskelett zu finden bzw. zu fesseln nach dem die Tumorzellen durch hochaffine Antikörper ihre Zielzellen binden und penetrieren.

Die Antikörper Binderegion ist z.B. Staphylokokken protein A (SPA), extrazelluläre Region des Fc Rezeptors CD 64 etc.

Die Mikrotubuli - Binderegion ist z.B. Gephyrin, MID - 1, MAP, Tau etc.

Diese Fusionsproteine können außerdem lange und superlange spacer bzw. - linkerregionen wie z.B. polyglyzin oder Polyprolin enthalten, die mit Membranpenetrationsdomäne (MBD) oder Proteintransduktionsdomäne (PTD) fusioniert sind.

Die Fusionsproteine können aus Immunantwort - auslösenden Regionen wie z.B. Fc, B 7.1 oder B 7.2 enthalten, um die Wirkung der Komplexe zu erhöhen.

Die Fusionsproteine können Nukleinsäure - oder Polysaccharid - Bindedomänen enthalten bzw. mit denen fusioniert werden, um durch Vernichtung bzw. erhöhte Konzentration die Wirkung zu verstärken.

Die Fusionsproteine können mit GFP oder anderen fluoreszenten Proteinen fusioniert werden, um ihre Wirkung optisch zu verfolgen oder ihre Konzentration durch Intensität der Fluoreszenz zu messen.

Außerdem können diese Fusionsproteine Gelenkregionen, wie z.B. Fünf - Glyzinregionen und mindestens eine GST-, Histag oder eine andere Region zur Durchführung der Affinitätsreinigung enthalten.

Die beschriebene Proteintransduktionsdomäne (PTD) ist eine elf - Aminosäure lange Region, die eine Region des HIV Tat Proteins darstellt.

Dem Forscher Dowdy und seinen Kollegen ist gelungen, 60 Proteine in der Größenordnung zwischen 15 kDa und 120 kDa zu fusionieren und nach folgender Denaturierung der Fusion mit Harnstoff ins Zytosol zu transportieren. (Science 285, 1569 - 1572, 1999 und Nature biotechnology Vol. 17 S. 942, Oct. 1999).

Nach der Internalisierung des Fusionsproteins wirkt die Mikrotubuli - Bindedomäne wie z.B. Gephyrin, Tau, MAP oder MID - 1 im Zytosol. Sie bindet Mikrotubuli und fesselt somit das Zytoskelett. Das dynamische Gleichgewicht (Wilde et al Nature cell biology 2001, March, vol. 3 und Carazo. Salas et al. Nature Cell biology 2001, March, vol.3.) der Mikrotubuli wird beeinträchtigt und die jeweilige Zelle kann sich nicht mehr teilen. Sobald sie sich nicht mehr teilt, stirbt sie.

Dadurch wird das Wachstum des Tumors, z.B. eines soliden Tumors gehemmt.

In der Fig. 1 der IgG - Antikörper - SPA - MBD - Fusionsprotein - Komplex schematisch dargestellt.

In der Fig. 2 ist der IgG - Antikörper - Fusionsprotein - Komplex schematisch dargestellt. Das Fusionsprotein enthält PTD, langen spacer, SPA und MBD.

In der Fig. 3 ist der IgG - Antikörper - Fusionsprotein - DNA - Komplex schematisch dargestellt.

Das Fusionsprotein enthält SPA, MBD und eine DNA - Bindedomäne, die DNA bindet.

In der Fig. 4 ist der IgG - Antikörper - SPA - MBD - GFP - Fusionsprotein - Komplex schematisch dargestellt.

In der Fig. 5 ist der IgG - Antikörper - Fusionsprotein - Komplex schematisch dargestellt.

Das Fusionsprotein enthält SPA, MBD und HLA - B7.1 - Region die eine zusätzlich T - Zell - aktivierung induziert.

Beispiel 1

Klonierung und Expression des Fusionskonstruktes SPA - 5G - Gephyrin

C DNA für Gephyrin wird durch PCR kloniert, bzw. die Homo sapiens Gephyrin (GPH) m RNA wird durch RT - PCR kloniert. Die Daten der GPH m RNA - Sequenz sind bei im Internet, beim National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda MD 208 94, USA erhältlich, sowie auf der Internet Seite von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/... eotide...>) zu finden.

C DNA für SPA ligiert mit dem Primer enthaltend die Information für die Fünf - Ghyzin - Spacer wird ebenfalls mit PCR kloniert.

Das Fusionsprotein wird aus PCR - Produkten zusammengesetzt. Die PCR - Primern sind so konstruiert, dass sie Restriktionsstellen auf 5' und 3' Enden enthalten, um spätere Ligationsschritte durchzuführen. Die 5' und 3' Enden des Gephyrin - PCR - Produkts enthalten Bam HI und Hind III Restriktionsstellen. Die 5' und 3' Enden des SPA - PCR - Produkts enthalten XmnI und Bg III Restriktionsstellen.

Nach der Amplifikation und Reinigung werden die PCR Produkten in PCR II Vektoren ligiert. Positive Klone werden durch Screening Plasmide richtiger Masse identifiziert. Die Klone werden durch DNA - Sequenzierung bzw. durch Standardmethoden überprüft bzw. bestätigt.

Das Gephyrin - PCR - Produkt wird aus der PCR II durch restriktive Spaltung durch Bam HI und Hind III herausgeschritten, und SPA - PCR - Produkt wird aus dem PCR II durch Xmn I und Bg III herausgeschnitten.

Ligation der gephyrin und SPA - Gegmente in den pMal - c 2 Expressionsvektor erfolgt unter Standard - Bedingungen. Der p Mal - c 2 Vektor wird mit Bam H I und Hind 3 behandelt. Der Gephyrin - Segment wird durch diese Behandlung in den pMal - c 2 hinein ligiert.

PMal - c 2 - Gephyrin wird mit X mnl und Bam HI und geschnitten, um SPA Segment hinein zu ligieren.

Ligationspuffer wird aus 66 mM Tris PH 7,6, 5 mM Mg cl₂, 5 mM DTT und 1 mM ATP, sowie aus der T4 DNA Ligase (insgesamt 20 Mikroliter) zusammengesetzt. Die Ligation wird bei 14°C durchgeführt.

Das Ligationsprodukt wird in E Coli transformiert, eaprimiert und abschliessend gereinigt.

Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinde und Mikrotubuli - Binderegionen

Patentansprüche

Beansprucht werden:

1. Fusionsproteine, dadurch gekennzeichnet dass sie Antikörperbinde - und Mikrotubulibinderegionen enthalten.
M3D
2. Fusionsproteine nach dem Anspruch 1, gekennzeichnet, durch immunauslösende Regionen.
3. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 und 2, gekennzeichnet durch lange und sehr lange Spacer Regionen.
4. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 3, gekennzeichnet durch Membranpenetrationsdomänen vorzugsweise am N - terminus der der langen oder superlangen Spacer Regionen.
5. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 4, gekennzeichnet durch mindestens eine Nukleisäurebinderegion.
6. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 5, gekennzeichnet durch mindestens eine Polysaccharid - binderegion. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Antigen binderegionen vorzugsweise aus folgenden Proteinen: EGF, FGF, CSF, MGF, IL - 15, ausgewählt werden.

7. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 6, gekennzeichnet durch GFP oder eine andere fluoreszente Region.

8. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 7, gekennzeichnet durch mindestens eine GST - Histag oder eine andere Region zur Durchführung der Affinitätsreinigung.

9. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 8, gekennzeichnet durch mindestens eine Gelenkregion vorzugsweise Fünf - Glycin - Region.

10. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, dass Antikörperbinderegionen vorzugsweise IgG binden und zwar Fc - Regionen der IgG binden und vorzugsweise aus folgenden regionen: Staphylokokkenprotein A (SPA), extrazelluläre Region des Fc Rezeptors CD 64 u.a. Regionen ausgewählt werden können.

11. Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Mikrotubulibinderegionen vorzugsweise aus folgenden Proteinen: Gephyrin, Tau, MAP, MID - 1 ausgewählt werden.

12. Nukleinsäuresequenzen, DNA - Vektoren, Klonierungs - und Expressionssysteme für die Fusionsproteine nach den Ansprüchen 1 - 11.

Fusionsproteine enthaltend Antikörperbinde und Mikrotubuli - Binderegionen

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Bereiche der Tumorphysiologie und der Biotechnologie.

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, penetrierende Antikörper, vorzugsweise IgG so zu modifizieren, dass sie das Zellwachstum hemmen und somit Tumor und Protozoenzellen schädigen können.

Die Aufgabe der Erfindung wird Fusionsproteine enthaltend Antikörper - Binde - und Mikrotubuli - Binderegionen gelöst.

FIG. 1

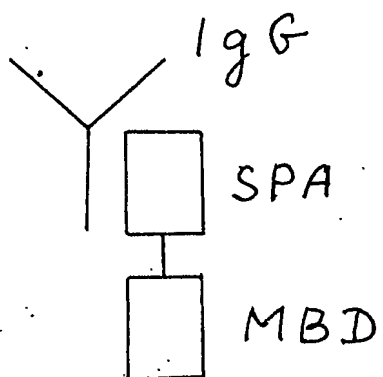


FIG. 2

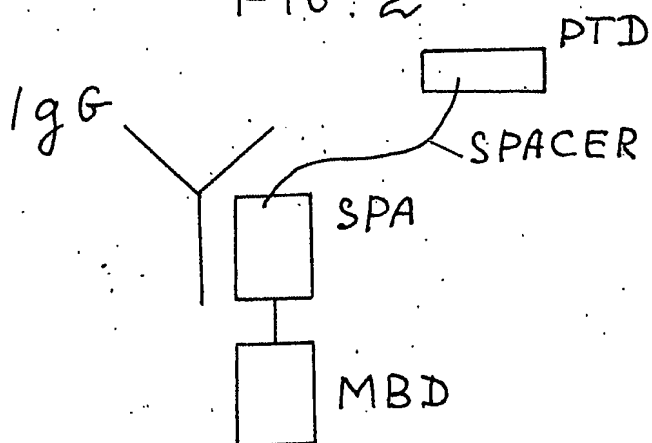


FIG. 3

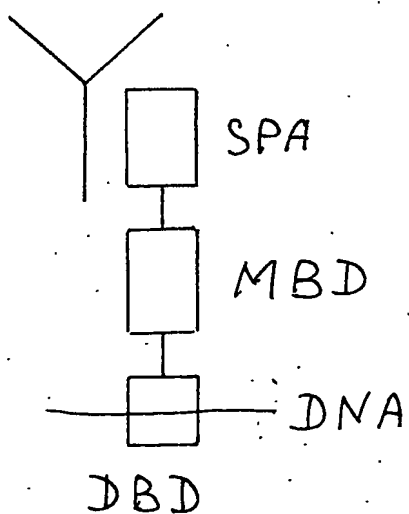


FIG. 4

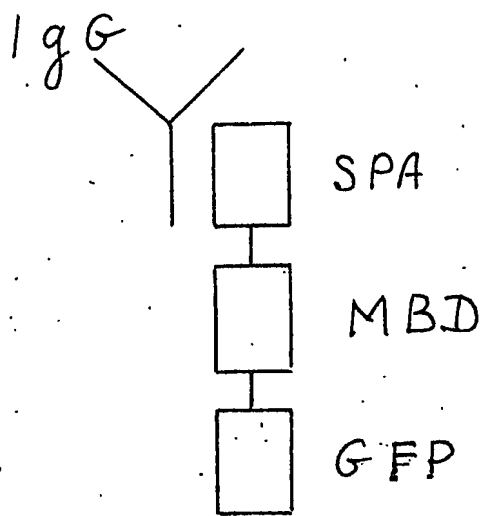


FIG. 5

